

Original Paper

Effect of sodium levothyroxine on knee articular cartilage tidemark integrity in hypothyroidism: A histomorphometric, histopathologic and biochemical study in animal model

Simin Fazelpour (Ph.D), Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6067-0351

Zahra Tootian (Ph.D), Professor, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-1260-080X

***Minoo Shafii (M.D)**, **Corresponding Author**, Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: minoo.shafii@gmail.com ORCID ID: 0000-0002-9042-0580

Moslem Dahmardeh (Ph.D), Ph.D in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3461-8189

Saba Mahjoub, Pharmacist, Faculty of Pharmacy, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0001-5406-3910

Neda Faal Hamedanchi, General Physician, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0003-3124-9936

Farzaneh Shivapoor, General Physician, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-2678-4304

Abstract

Background and Objective: Sodium levothyroxine is one of the common medicines used for treatment of hypothyroidism and thyroid cancer. The study was done to determine the effect of sodium levothyroxine on knee articular cartilage tidemark integrity, plateau tibia cartilage thickness (calcified and non-calcified) and liver enzymes in induced hypothyroidism rats.

Methods: In this experimental study, 50 adult female BALB/c mice, weighting 25-30 grams were randomly allocated into one control and four experimental groups. Animals in control did not receive any medicine. Animals in the second group were received different increasing doses of sodium levothyroxine daily for 8 weeks. Animals in the third group were received constantly high dose of levothyroxine daily for 8 weeks. In the fourth group, the animals became hypothyroid with propylthiouracil (PTU). In the fifth group, animals with hypothyroidism were received sodium levothyroxine by gavage same as group 2. After 8 weeks serum samples were taken to determine ALT, AST and ALP. The plateau tibia cartilage stained with hematoxylin-eosin. Histologic changes evaluated by light microscopy. Using a light microscope equipped with camera, the samples were photographed and using a computer equipped with axiovision software. Cartilage (calcified and non-calcified) thickness measured in micrometer. The integrity of tidemark line on hematoxylin-eosin staining also evaluated.

Results: The results of the present study showed separation, disruption and destruction in tidemark line in group 3 (the group with high dosage of sodium levothyroxine from the beginning of the treatment). The total cartilage and non-calcified part thickness in groups 3, 4, 5 were reduced and in group 3 showed significant reduction ($P<0.05$). Calcified cartilage thickness in all groups were reduced and in group 3 showed significant reduction ($P<0.05$). ALT level decreased in all groups compared to control group but only in the second and third groups, the decrease of ALT was significant ($P<0.05$). AST serum level in all groups significantly increased in compared to control group ($P<0.05$). ALP serum level in all groups increased compared to the control group, but this increase was significant only in the groups 4, 5.

Conclusion: Consumption of sodium levothyroxine with constantly high dose can cause severe alteration in knee joint cartilage in hypothyroidism rats.

Keywords: Hypothyroidism, Sodium levothyroxine, Knee Joint, Cartilage, Liver

Received 23 Jun 2019

Revised 23 Jul 2019

Accepted 13 Nov 2019

Cite this article as: Fazelpour S, Tootian Z, Shafii M, Dahmardeh M, Mahjoub S, Faal Hamedanchi N, Shivapoor F. [Effect of sodium levothyroxine on knee articular cartilage tidemark integrity in hypothyroidism: A histomorphometric, histopathologic and biochemical study in animal model]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Summer; 22(2): 26-33. [Article in Persian]

اثر مصرف لووتیروکسین سدیم بر روی خط tidemark غضروف مفصل زانو، ضخامت غضروف و آنزیم‌های کبدی در هیپوتیروئیدیسیم: یک بررسی هیستومورفومتریک، هیستوپاتولوژیک و

بیوشیمیایی در مدل حیوانی

ORCID ID: 0000-0002-6067-0351

ORCID ID: 0000-0002-1260-080X

ORCID ID: 0000-0002-9042-0580

ORCID ID: 0000-0002-3461-8189

ORCID ID: 0000-0001-5406-3910

ORCID ID: 0000-0003-3124-9936

ORCID ID: 0000-0002-2678-4304

دکتر سیمین فاضلی پور، استاد گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دکتر زهرا طوطیان، استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* دکتر مینو شفیعی، استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دکتر مسلم دهمرده، دکتری تخصصی آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دکتر صبا محجوب، داروساز، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دکتر ندا فعال همدانچی، پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

دکتر فرزانه شیواپور، پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لووتیروکسین سدیم یکی از داروهای رایج مورد استفاده در درمان مبتلایان به هیپوتیروئیدی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر مصرف لووتیروکسین سدیم بر روی خط tidemark غضروف مفصل زانو، ضخامت غضروف و آنزیم‌های کبدی در هیپوتیروئیدیسیم موش سوری انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش سوری ماده بالغ نژاد BALB/c به وزن ۲۵-۳۰ گرم انجام شد. حیوانات به یک گروه کنترل و چهار گروه تجربی تقسیم شدند. در گروه یک (گروه کنترل) از هیچ دارویی استفاده نشد. گروه دوم دوزهای متفاوت افزایشی لووتیروکسین (دو هفته اول ۱/۵ mg/kg/bw، دو هفته دوم روزانه ۲ mg/kg/bw، دو هفته سوم ۲/۵ mg/kg/bw و دو هفته چهارم ۳ mg/kg/bw) به طور روزانه در ۸ هفته و گروه سوم از ابتدا دوز بالا و ثابت لووتیروکسین (۳ mg/kg/bw) را روزانه به صورت گاوژ دریافت کردند. در گروه چهارم هیپوتیروئیدی با propylthiouracil (PTU) القاء گردید. در گروه پنجم، حیوانات هیپوتیروئید، لووتیروکسین سدیم را به روش گاوژ مانند گروه دوم دریافت نمودند. بعد از ۸ هفته نمونه‌های سرمی برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP)، آسپارات ترانس آمیناز (Aspartate transaminase: AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine aminotransferase: ALT) تهیه شد. غضروف طبق تیبیای مفصل زانوها با روش هماتوکسیلین - انوزین رنگ‌آمیزی شد. به کمک میکروسکوپ مجهز به دوربین عکسبرداری از اسلایدها صورت گرفت و میزان ضخامت غضروف، بخش کلسیفیه و غیرکلسیفیه برحسب میکرومتر توسط نرم‌افزار کامپیوتری axiovision اندازه‌گیری شد. همچنین وضعیت یکپارچگی خط tidemark در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - انوزین با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده جداشدگی و از هم گسیختگی در خط tidemark در گروه سوم (گروه دریافت‌کننده لووتیروکسین سدیم با دوز بالا و ثابت) بود. در گروه‌های سوم، چهارم و پنجم کاهش ضخامت غضروف در منطقه غیرکلسیفیه دیده شد که این کاهش در گروه سوم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/05$). ضخامت منطقه کلسیفیه در تمام گروه‌ها کاهش نشان داد که این کاهش در گروه سوم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در بررسی آنزیم‌های ALP و AST در اکثر گروه‌ها با افزایش و میزان آنزیم ALT در اکثر گروه‌ها با کاهش همراه بود که این تغییرات نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: مصرف لووتیروکسین سدیم با دوز ثابت و بالا باعث ایجاد تغییرات شدید غضروف مفصل زانو در مقایسه با دوز افزایشی در حیوانات مبتلا به هیپوتیروئیدیسیم می‌گردد.

کلید واژه‌ها: هیپوتیروئیدی، لووتیروکسین سدیم، مفصل زانو، غضروف، کبد

* نویسنده مسؤول: دکتر مینو شفیعی، پست الکترونیکی minoo.shafii@gmail.com

نشانی: تهران، خیابان شریعتی، خیابان خاقانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تلفن ۰۲۱-۲۲۰۰۶۶۶۰-۷

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۴/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۵/۱، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۸/۲۲

مقدمه

غضروف مفصلی از نوع غضروف هیالین بوده و معمولاً ضخامتی حدود ۲-۴ میلی‌متر دارد و متشکل از کندروسیت‌ها و ماتریکس خارج سلولی (ECM) سرشار از گلیکوزآمینو گلیکان،

غضروف یک نوع بافت همبند تخصص یافته حمایتی سخت و انعطاف‌پذیر بوده که فاقد عروق خونی، لنفاتیک و اعصاب است.

بین tidemark و استخوان ساب کندرال مطالعه شد. در خرگوش‌های دریافت کننده دوز ۰/۵ درصد Levobupivacaine داخل مفصل شانه به مدت ۱۵ روز، تغییرات مشخص هیستومورفومتری براساس ضخامت غضروف کلسیفیه، غضروف غیر کلسیفیه و خط tidemark براساس mankin scoring (نوعی روش سنجش شدت صدمات غضروفی در استئوآرتروز) مشخص گردید. mankin score در این گروه در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی score بالاتری را دارا بود و تغییر معنی‌داری را نشان داد (۷). همچنین در مطالعه Permuy و همکاران داروی Diacerein روی غضروف مفصلی زانوی خرگوش‌های فاقد استئوآرتروز؛ سبب کاهش ضخامت کل غضروف، غضروف غیر کلسیفیه و غضروف کلسیفیه گردید. درمان با Diacerein در بهبود تورم استئوآرتروز نیز موثر بود (۸). مطالعه Li و همکاران نشان داد که داروی Tougo Xiaotong پیشروی در تخریب غضروف بیماران مبتلا به استئوآرتروز القا شده توسط پاپائین را با تنظیم اتوفاژی کندروسیت‌ها مهار می‌کند. همچنین مصرف این نوع دارو می‌تواند بر روی tidemark اثر گذاشته و سبب پیشروی tidemark و تاخیر در انهدام غضروف در مبتلایان به استئوآرتروز گردد (۹). در مطالعه Zoeger و همکاران چند بیماری که با بیماری‌های حاد فوت کرده بودند و سابقه‌ای از تماس شغلی با سرب و یا وجود بیماری‌های متابولیک استخوانی نداشتند؛ از لحاظ تجمع چند عنصر سرب، روی، استرونیوم و کلسیم در نواحی سر استخوان فمور و استخوان پاتلا بررسی شدند. نتایج تجمع سرب را در خط tidemark که خط مقدم فعال متابولیک از فرایند میترالیزاسیون است را نشان داد (۱۰). لوتیروکسین سدیم یکی از داروهایی است که برای درمان هیپوتیروئیدی، درمان جایگزینی هورمونی به دنبال تیروئیدکتومی در سرطان تیروئید و همچنین جلوگیری از عود سرطان استفاده می‌گردد (۱۱). با توجه به مصرف گسترده لوتیروکسین سدیم در اختلالات مربوط به تیروئید و نبود داروی مناسب برای جایگزینی آن، این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی لوتیروکسین سدیم بر روی خط tidemark غضروف مفصل زانو، ضخامت غضروف (بخش کلسیفیه و غیر کلسیفیه) طبق تیبای مفصل زانو و آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP)، آسپاراتات ترانس آمیناز (Aspartate transaminase: AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine aminotransferase: ALT) انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش سوری ماده بالغ نژاد BALB/c به وزن ۲۵-۳۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی

پروتئوگلیکان‌ها، آب، کلاژن و سایر پروتئین‌های غیر کلاژنی به میزان اندک است. کلسیفیکاسیون غضروف یک مرحله اساسی در فرایند رشد طبیعی استخوان از طریق استخوان‌سازی داخل غضروفی است. بعضاً کندروسیت‌ها دچار آپوپتوز شده و به دنبال آن کلسیفیکاسیون ماتریکس غضروف با تشکیل کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت روی می‌دهد (۲۰).

غضروف مفصلی از دو لایه بر اساس وجود و یا عدم وجود کلسیفیکاسیون تشکیل می‌شود. لایه سطحی غیر کلسیفیه توسط خط tidemark از لایه عمقی کلسیفیه مجزا می‌گردد. tidemark خطی منفرد و بازوفیل با ضخامتی حدود ۱۰ میکرومتر است (۳ و ۴). الیاف کلاژن از غضروف کلسیفیه به سمت خط tidemark پیشروی نموده و سپس به صورت الیاف عمودی به منطقه غیر کلسیفیه غضروف وارد می‌شوند. در حالی که الیاف کلاژن از سمت غضروف کلسیفیه به سمت استخوان زیرین هیچگونه پیشروی ندارند. به دلیل عدم وجود رگ‌های خونی در غضروف مفصلی این بافت نسبت به سایر بافت‌ها قابلیت ترمیم کمتری داشته و آن را مستعد بروز بیماری‌های مفصلی می‌کند. خط tidemark دارای اهمیت مکانیکی زیادی است. زیرا ضعیف‌ترین منطقه در غضروف بوده و مستعد ایجاد شکاف است. جداشدگی غضروف در خط tidemark در انسان در شکستگی‌ها و استئوآرتروز گزارش شده است. همچنین گزارشات دال بر این تغییر در موش سوری، موش صحرائی، خوکچه هندی و همستر نیز بیان شده است که مکانیسم آن هنوز به درستی شناخته نشده است؛ ولی ظاهراً فشارهای بیش از حد مماسی سبب ایجاد شکاف در فیبریل کلاژنی در tidemark می‌گردد (۴).

مطالعات مختلف سلولی و ملکولی نقش مهم هورمون‌های تیروئیدی در ساختار عملکرد استخوان و غضروف را نشان می‌دهند. این هورمون‌ها بر روی کندروسیت‌ها و صفحه رشد نیز اثر می‌گذارند. آنها برای رشد طبیعی، تکامل و عملکرد ارگان‌های مختلف اساسی هستند. این هورمون‌ها میزان متابولیسم پایه تمام سلول‌های بدن از جمله سلول‌های کبدی را تنظیم می‌نمایند. بنابراین عملکرد کبدی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. متابولیسم هورمون تیروئیدی در کبد انجام شده و بدین ترتیب اثرات اندوکراین سیستمیک خود را اعمال می‌کنند. لذا اختلالات عملکرد تیروئید، عملکرد کبد را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۵ و ۶).

در بازنگری منابع در مورد اثرات داروها بر روی غضروف مفصلی مطالعاتی انجام شده است. در مطالعه Ozcan و همکاران اثر دوزهای مختلف انجام شد. مفصل گلهومورال آنها به صورت ماکروسکوپی و همچنین پس از آماده‌سازی بافتی بررسی‌های هیستومورفومتری به صورت اندازه‌گیری ضخامت غضروف کلسیفیه

تهران طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی (IR.IAU.TMU.REC.1395.024) قرار گرفت.

حیوانات داخل قفس‌های مخصوصی با دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵-۵۰ درصد در حیوانخانه دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران نگهداری شدند. پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات رعایت گردید.

حیوانات به ۵ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند (۱۳ و ۱۲).

گروه اول (کنترل): از هیچ دارویی استفاده نگردید.

گروه دوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاوآژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.

گروه سوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاوآژ به مدت ۸ هفته به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.

گروه چهارم: حیوانات این گروه با استفاده از داروی Propyl thiouracil (PTU) به مدت یک ماه به هیپرتیروئیدیسم مبتلا شدند.

گروه پنجم: حیوانات مبتلا به هیپرتیروئیدیسم، روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی را با روش گاوآژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

پس از هشت هفته، حیوانات را بیهوش کرده و برای بررسی‌های بیوشیمیایی از قلب آنها خونگیری به عمل آمد. نمونه سرم خون تهیه و به آزمایشگاه برای بررسی سطح سرمی آنزیم‌های کبدی ارسال گردید. آنزیم‌های کبدی با روش کالریمتری (colorimetric UV) و بر مبنای IU/L سنجیده شدند. پس از خونگیری اندام‌های عقبی حیوانات را خارج نمودیم. پس از جدا نمودن پوست و گوشت، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از دکلسیفیکاسیون، مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه

برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. برای بررسی نمونه‌های بافتی از هر حیوان ۴ اسلاید و از هر اسلاید ۴ میدان دید مورد بررسی قرار گرفت. نیمی از نمونه‌ها با هماتوکسیلین - اتوزین و نیمی دیگر با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند. سپس بررسی‌های هیستومورفومتریک، هیستوپاتولوژیک بر روی مقاطع متعدد توسط میکروسکوپ نوری به عمل آمد. به کمک فنومیکروسکوپ، از اسلایدها عکسبرداری شد و با استفاده از نرم‌افزار Axiovision بخش میانی غضروف طبق تیبا دایره‌ای به قطر ۱۰۰ میکرومتر در نظر گرفته شد و میزان ضخامت بخش غیر کلسیفیه، بخش کلسیفیه و کل ضخامت غضروف بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری گردید. وضعیت خط tidemark نیز در رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین - اتوزین و تولوئیدین بلو با میکروسکوپ نوری بررسی گردید. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین خط tidemark مشخص تر دیده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-9.1 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها از آزمون چنددامنه‌های Dunckan و برای مقایسه بین گروه‌ها از Tukey test استفاده گردید. سطح معنی‌داری برای همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ لحاظ گردید.

یافته‌ها

اثرات مصرف لووتیروکسین سدیم به صورت جداشدگی و از هم گسختگی خط tidemark در گروه سوم که از ابتدا دوز بالا و ثابت دارو را دریافت نمودند؛ مشاهده گردید. در مقایسه با گروه سوم، سایر گروه‌ها که تحت درمان با دوز افزایشی دارو قرار گرفته بودند؛ تغییر مشخصی در خط tidemark دیده نشد (شکل یک).

ضخامت بخش میانی غضروف طبق تیبا در گروه‌های سوم، چهارم و پنجم نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد که در گروه سوم این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول یک و شکل‌های ۳ و ۴).

در بررسی ضخامت منطقه غیر کلسیفیه در گروه‌های سوم، چهارم و پنجم نسبت به گروه کنترل کاهش مشاهده گردید و این کاهش

جدول ۱: نتایج هیستومورفومتریک ضخامت قسمت‌های مختلف غضروف طبق تیبا (n=6)

گروه‌ها	قسمت غیر کلسیفیه غضروف	قسمت کلسیفیه غضروف	کل ضخامت غضروف
کنترل	۴۱/۶۸±۳/۷۶ a	۶۳/۵۷±۹/۸۷ a	۱۰۳/۵۸±۹/۰۹ a
دوم	۴۵/۰۱±۶/۶۶ a	۶۲/۴۱±۱۲/۰۹ a	۱۰۵/۵۱±۹/۶۳ a
سوم	۲۵/۳۷±۶/۲۹ b	۳۷/۴۵±۵/۴۵ b	۶۲/۸۲±۶/۰۱ b
چهارم	۳۷/۸۴±۵/۵۳ a	۶۰/۹۸±۱۱/۰۳ a	۹۸/۸۲±۱۴/۰۷ a
پنجم	۳۹/۶۴±۷/۱۱ a	۶۲/۳۲±۱۱/۳۵ a	۱۰۱/۹۶±۱۲/۱۳ a

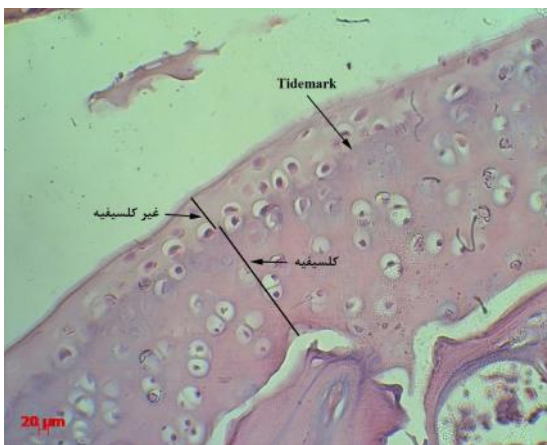
گروه کنترل: از هیچ دارویی استفاده نگردید. گروه دوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاوآژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ گروه سوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاوآژ به مدت ۸ هفته به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ گروه چهارم: مبتلا به هیپرتیروئیدیسم؛ گروه پنجم: حیوانات دارای هیپرتیروئیدیسم دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی را با روش گاوآژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.

حرف a در ردیف عمودی: عدم معنی‌داری؛ حروف b و c در ردیف عمودی در مقایسه با گروه کنترل: $P < 0/05$

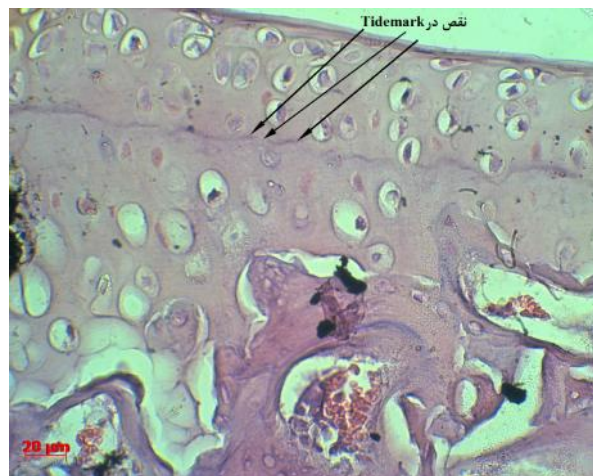
جدول ۲: بررسی بیوشیمیایی سطح آنزیم‌های کبدی در گروه‌های مورد مطالعه

Alkaline Phosphatase (IU/L)	Aspartate transaminase (IU/L)	Alanine aminotransferase (IU/L)	گروه‌ها
20±8/07 a	127/17±16/71 a	265/33±16/52 a	کنترل
35/67±5/12 a	255/5±64/64 b	150/17±94/42 b	دوم
36/13±6/21 a	274/33±28/19 b	192±19/58 b	سوم
56/17±14/34 b	251/13±100/41 b	217/67±64/26 ac	چهارم
55/17±13/16 b	335/67±47/17 c	253/17±97/5 ac	پنجم

گروه کنترل: از هیچ دارویی استفاده نگردید. گروه دوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاواژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ گروه سوم: دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاواژ به مدت ۸ هفته به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ گروه چهارم: مبتلا به هیپرتیروئیدسم؛ گروه پنجم: حیوانات دارای هیپرتیروئیدسم دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی را با روش گاواژ در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.
حرف a در ردیف عمودی: عدم معنی داری؛ حروف b و c در ردیف عمودی در مقایسه با گروه کنترل: P<0/05



شکل ۲: گروه کنترل (رنگ آمیزی هماتوکسین-انئوزین؛ بزرگ نمایی ۱۰۰x) هیچگونه شکافی در خط tidemark مشاهده نمی‌گردد.



شکل ۱: تغییرات حاصل از مصرف لووتیروکسین سدیم در خط tidemark (رنگ آمیزی هماتوکسین-انئوزین؛ بزرگ نمایی ۴۰۰x) تغییرات به صورت جداشدگی و از هم گسیختگی در خط tidemark در گروه دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاواژ به مدت ۸ هفته به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (گروه سوم) مشاهده شد. محل ضایعه با پیکان مشخص شده است.



شکل ۴: تغییرات حاصل از مصرف لووتیروکسین سدیم در خط tidemark (رنگ آمیزی هماتوکسین-انئوزین؛ بزرگ نمایی ۱۰۰x) کاهش ضخامت قسمت غیرکلسیفیه در گروه دریافت کننده روزانه لووتیروکسین سدیم خوراکی با روش گاواژ به مدت ۸ هفته به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (گروه سوم) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود.



شکل ۳: گروه کنترل (رنگ آمیزی هماتوکسین-انئوزین؛ بزرگ نمایی ۴۰۰x) هیچگونه شکافی در خط tidemark مشاهده نمی‌گردد.

تکثیر خط tidemark در استئوآرتریت است (۳). به دنبال آن یکپارچگی محل اتصال قسمت کلسیفیه با قسمت غیر کلسیفیه غضروف با ایجاد شکاف‌هایی در این منطقه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این شکاف‌ها می‌توانند در اندازه‌های مختلف باشند. ماتریکس موجود در اطراف شکاف‌ها حاوی الیاف کلاژنی هستند که فاقد پروتئوگلیکان بوده؛ لذا با افزایش اندازه شکاف‌ها این الیاف کلاژنی که دارای ماتریکس گرانولر اندکی است به داخل حفره پیشروی نموده و کندروسیت‌های مجاور چروکیده و حاوی هسته بیکنونیک می‌شوند. با افزایش اندازه شکاف تمایل رنگ‌پذیری به سافرانین O، کاهش یافته و سطح مفصلی غضروف برجسته می‌گردد. همانطور که قبلاً ذکر شد شکاف‌های موجود در tidemark اثرات قابل توجهی در یکپارچگی غضروف ایجاد می‌کنند. عدم پیوستگی محدوده غضروف غیر کلسیفیه با کلسیفیه منجر به تجمع نیروهای فشاری مماسی در غضروف درست در بالای نقطه پارگی می‌گردد و باعث ایجاد اثری فشاری روی غضروف می‌شود. به دنبال آن، برجستگی در سطح غضروف ایجاد شده که در واقع سطحی با نیروی اصطکاکی بیشتر و نیروی برشی موضعی شدیدتری به وجود می‌آورد. سطح غضروفی پوشاننده شکاف‌های بزرگ‌تر از بافت غضروفی اطراف، برجسته‌تر شده که این مسأله در واقع ناشی از کاهش پروتئوگلیکان و از بین رفتن کندروسیت‌ها در این مناطق است و عواقب پاتولوژیک چنین نقایصی با گذشت زمان شدت می‌یابد (۴). لذا در صورت صدمه دیدن خط tidemark شرایط برای کلسیفیکاسیون بخش غیر کلسیفیه و کاهش ضخامت آن در مقایسه با گروهی که دارای خط tidemark آسیب ندیده هستند؛ مهیا می‌شود. در مطالعه حاضر مشخص شد که لووتیروکسین سدیم سبب جداشدگی و از هم گسیختگی در خط tidemark در گروه دریافت کننده با دوز بالای لووتیروکسین سدیم (گروه سوم) می‌شود. از طرفی کاهش ضخامت قسمت غیر کلسیفیه در گروه‌های سوم، چهارم و پنجم به خصوص گروه سوم، قابل توجه بود. در بررسی ضخامت منطقه کلسیفیه در تمام گروه‌ها، کاهش ضخامت وجود داشت و این کاهش در گروه سوم معنی‌دار بود. در مطالعه Soner ozcan و همکاران مصرف Levo bupivacaine روی غضروف مفصل شانه خرگوش‌های مورد مطالعه، نامنظمی در سطح غضروفی، از هم گسیختگی در خط tidemark، هیپرتروفی کندروسیت‌ها و کاهش در ماتریکس خارج سلولی ایجاد نمود (۸). در مطالعه Permy و همکاران داروی Diacerein روی غضروف مفصلی زانوی خرگوش‌های فاقد استئوآرتریت، سبب کاهش ضخامت غضروف، قسمت غیر کلسیفیه و قسمت کلسیفیه گردید (۸). از طرفی در مطالعه Li و همکاران داروی Tougo xiaotong سبب

در گروه سوم از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول یک و شکل‌های ۳ و ۴).

در بررسی ضخامت منطقه کلسیفیه، در تمام گروه‌ها کاهش ضخامت وجود داشت و این کاهش ضخامت در گروه سوم در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها قابل توجه بود ($P < 0/05$) (جدول یک).

در بررسی تست‌های بیوشیمیایی سطح سرمی ALT در گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۲). سطح سرمی AST در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل دارای افزایش آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول ۲). سطح سرمی ALP در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد که این افزایش تنها در گروه‌های چهارم و پنجم از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (جدول ۲).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، لووتیروکسین سدیم بر روی یکپارچگی خط tidemark، ضخامت بخش‌های کلسیفیه و غیر کلسیفیه طبق تبیبا و سطح سرمی آنزیم‌های کبدی اثر دارد. بافت غضروفی در مقایسه با سایر بافت‌ها از سیستم خون‌رسانی ضعیف‌تری برخوردار است. لذا توانایی ترمیم آن نیز کمتر است. بررسی‌ها نشان داده که بافت غضروفی توسط هورمون‌ها و عوامل دارویی مختلف تحت تاثیر قرار می‌گیرد. لذا مطالعه اثر لووتیروکسین سدیم، دارویی که به طور وسیع در درمان هیپوتیروئیدی و سرطان تیروئید کاربرد دارد؛ بر غضروف و خط tidemark حایز اهمیت است. tidemark مرز بین قسمت کلسیفیه و غیر کلسیفیه در غضروف مفصلی را مشخص می‌کند و به صورت خط منفرد بازوفیل به ضخامت حدود $10 \mu\text{m}$ توصیف می‌گردد. کندروسیت‌های مجاور خط tidemark باز چرخش اجزا غیر کلاژنی ماتریکس خارج سلولی را تنظیم نموده و در حالت رشد و تکامل طبیعی نشان‌دهنده پیشروی فرایند کلسیفیکاسیون بوده و به عنوان یک ساختار منفرد پیشروی مواد معدنی از سمت کلسیفیه به سمت غیر کلسیفیه در غضروف شفاف را متوقف می‌کنند. گرچه باز چرخش باقیمانده ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌گردد (۱۲). در این شرایط خط tidemark مانع پیشروی کلسیفیکاسیون می‌شود. گرچه اتصالات محکم کلسیم به آن هنوز وجود دارد. در این حالت ممکن است عملکرد tidemark به مهار رشد یا تشکیل میکرو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت تغییر یابد و مانع معدنی شدن پیشرونده غیرفعال غضروف شفاف گردد. این تغییر ممکن است غیر قابل برگشت باشد. لذا اگر معدنی شدن جدید (به عنوان مثال در استئوآرتریت) رخ دهد؛ یک خط tidemark جدید دیستال به خط قبلی به طور فعال ایجاد می‌شود و سبب غیرفعال شدن خط قبلی tidemark می‌گردد که توجیه کننده

کبدی، عامل این اتفاق است (۶۵). تست‌های عملکرد کبد شامل آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز هستند که نشان‌دهنده تغییر آنزیم‌های کبدی است که به دنبال آن عملکرد کبد تغییر می‌کند. در این مطالعه نشان داد شد که میزان ALP در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت که این افزایش در گروه چهارم و پنجم معنی‌دار بود. میزان AST نیز در تمام گروه‌ها افزایش یافت و این افزایش در گروه پنجم واضح‌تر بود. در تمام گروه‌ها با کاهش سطح آنزیم ALT در مقایسه با گروه کنترل مواجه بودیم که می‌توان نتیجه‌گیری کرد مصرف لووتیروکسین سدیم می‌تواند در عملکرد کبد نیز موثر واقع شود. در مطالعه مدنی و همکاران مشخص گردید هیپرتیروئیدی اغلب با اختلالات آنزیم‌های کبدی به خصوص افزایش ALT و ALP همراه است؛ ولی تفاوت قابل توجهی در میزان AST دیده نشد (۱۷). در مطالعه Upadhyay و همکاران افزایش T3 سبب القای آپوپتوز هپاتوسیت‌ها و اختلال عملکرد کبدی از طریق آسیب میتوکندری گردید (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از دوز زیاد لووتیروکسین می‌تواند بر خط tidemark که در استحکام غضروف نقش دارد؛ اثر گذاشته و همچنین سبب کاهش ضخامت غضروف و منطقه غیرکلسیفیه گردد. تغییراتی نیز در آنزیم‌های کبدی با افزایش ALP و AST و کاهش ALT دیده شد. لذا توصیه می‌گردد در استفاده از این دارو جانب احتیاط رعایت گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی (شماره ۱۰۴۰۱۰۴/۱۹۱۰۴۱۳۶) مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران بود و بدین وسیله از آن معاونت محترم صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Mescher LA. Junqueira's Basic histology text & atlas. 14th ed. New York: McGraw-Hill. 2016; pp: 175-204.
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009 Nov; 1(6): 461-68. DOI: 10.1177/1941738109350438
- Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol*. 2005 Mar; 36(3): 207-15. DOI: 10.1007/s10735-005-3283-x
- Otterness IG, Chang M, Burkhardt JE, Sweeney FJ, Milici AJ. Histology and tissue chemistry of tidemark separation in hamsters. *Vet Pathol*. 1999 Mar; 36(2): 138-45. DOI: 10.1354/vp.36-2-138
- Khanam S. Impact of Thyroid on Liver Metabolism. *Endocrinol Res Metab*. 2017; 1(2): 6.
- Malik R, Hodgson H. The relationship between the thyroid gland and the liver. *QJM*. 2002 Sep; 95(9): 559-69. DOI: 10.1093/qjmed/95.9.559

تاخیر تخریب غضروفی در خرگوش‌های مبتلا به استئوآرتریت القا شده توسط پاپائین گردید و نیز سبب مهار تکثیر خط tidemark غضروفی شد (۹). در این مطالعه تغییرات قابل توجه در سطح غضروف مشاهده شد که شاید به دلیل مصرف هشت هفته لووتیروکسین باشد. در صورتی که زمان مصرف آن افزایش یابد؛ شاید شاهد تغییرات بیشتری در سطح غضروف در صورت آسیب به tidemark باشیم. همان‌طور که قبلاً اشاره شد؛ هیپوتیروئیدی عارضه شایع به خصوص در میانسالی است. هورمون‌های تیروئیدی در سطح سلولی موجب تکثیر و تمایز در استخوان و غضروف می‌شوند و از طرف دیگر بین TSH و هورمون‌های تیروئیدی رابطه فیدبک منفی برقرار است. رسپتورهای هورمون‌های تیروئیدی شامل TR 1، TR 2 و TR 1 هستند که با لیگاند بامیل ترکیبی بالا ترکیب شده و فاکتور رونویسی را وادار می‌کنند که ژن‌های هدف در پاسخ به T3 را بیان کنند (۱۴). هورمون‌های تیروئیدی برای هماهنگی استخوانی شدن غضروف، تحریک بیان ژنها و کنترل بلوغ کندروسیت‌ها، سنتز ماتریکس غضروفی و معدنی شدن آنها لازم هستند (۱۵). در این مطالعه شاید مصرف لووتیروکسین با دوز زیاد موجب صدمه به خط tidemark و به دنبال آن سبب کاهش ضخامت غضروف در مقایسه با گروه کنترل شده است. در این ارتباط محققین دیگر نیز گزارشاتی مبنی بر افزایش خطر شکستگی استخوان و تخریب غضروف مفصل زانو را در گروه مصرف‌کننده لووتیروکسین سدیم با دوز زیاد گزارش نموده‌اند (۱۶). از عوارض هیپرتیروئیدی افزایش متابولیسم است که منجر به صدمات اکسیداتیو در ارگان‌هایی مثل سیستم‌های قلبی - عروقی، عصبی، گوارشی و کبدی می‌شود. کبد نقش مهمی در متابولیسم هورمون‌های تیروئیدی دارد. متقابلاً هورمون‌های تیروئیدی نیز عملکرد کبدی را تنظیم می‌کنند. پاتوزنز اختلالات کبدی در این رابطه هنوز ناشناخته است؛ ولی ظاهراً هیپوکسی نسبی در مناطقی از کبد به خصوص مرکز لوبول‌های

- Özcan MS, Kalem M, Özçelik M, ahin E, Çakar S, Hayırlı N, et al. The effect of intra-articular levobupivacaine on shoulder cartilage at different doses-experimental study. *Braz J Anesthesiol*. 2017 Jan - Feb; 67(1): 42-49. DOI: 10.1016/j.bjane.2015.08.008
- Permuy M, Guede D, López-Peña M, Muñoz F, Caeiro JR, González-Cantalapiedra A. Effects of diacerein on cartilage and subchondral bone in early stages of osteoarthritis in a rabbit model. *BMC Vet Res*. 2015; 11: 143. DOI: 10.1186/s12917-015-0458-x
- Li X, Lang W, Ye H, Yu F, Li H, Chen J, et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy. *Int J Mol Med*. 2013 Jun; 31(6): 1349-56. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1341
- Zoeger N, Roschger P, Hofstaetter JG, Jokubonis C, Pepponi G, Falkenberg G, et al. Lead accumulation in tidemark of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Sep; 14(9): 906-13. DOI: 10.1016/j.joca.2006.03.001
- Martins de Almeida JF, Gonçalves Tsumura W, Vaisman M,

Montalli Assumpção LV, Ward LS. Current recommendations for levothyroxine treatment of differentiated thyroid cancer patients are not properly implemented in clinical practice. *J Endocrinol Invest.* 2012 Nov; 35(10): 901-904. DOI: 10.3275/8369

12. Ferreira E, Silva AE, Serakides R, Gomes AES, Cassali GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007; 59(5): 1245-49.

13. Boeloni JN, Freitas Silva J, Magalhaes FC, Goes AM, Serakides R. Bone site-dependent effects on femur and vertebrae of female rats with thyroid dysfunctions. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(5): 291-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522010000500009>

14. Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid.* 2002 Jun; 12(6): 441-46. DOI:

10.1089/105072502760143791

15. Williams GR. Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *Eur Thyroid J.* 2013 Mar; 2(1): 3-13. DOI: 10.1159/000345548

16. Ko YJ, Kim JY, Lee J, Song HJ, Kim JY, Choi NK, et al. Levothyroxine dose and fracture risk according to the osteoporosis status in elderly woman. *J Prev Med Public Health.* 2014 Jan; 47(1): 36-46. DOI: 10.3961/jpmph.2014.47.1.36

17. Madani SH, Rostami Far Z, Jalilian N, Zare ME, Shaveisi Zadeh F. Evaluate the liver function in hyperthyroidism patients. *J Paramed Sci.* 2014; 5(2): 75-78.

18. Upadhyay G, Singh R, Kumar A, Kumar S, Kapoor A, Godbole MM. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology.* 2004 Apr; 39(4): 1120-30. DOI: 10.1002/hep.20085